

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(1) Número de publicación: **2 160 495**

(2) Número de solicitud: 009901235

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: A61K 38/22

A61P 37/02

(12)

PATENTE DE INVENCION

B1

(22) Fecha de presentación: **04.06.1999**(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2001**Fecha de concesión: **30.07.2002**(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.09.2002**(45) Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.09.2002**(73) Titular/es: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DE MADRID  
Rectorado - Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**(72) Inventor/es: **Pérez Gomariz, Rosa;  
Leceta Martínez, Javier;  
Delgado Mora, Mario y  
Martínez Mora, Carmen**(74) Agente: **No consta**(54) Título: **Uso de los péptidos VIP y PACAP para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.**

(57) Resumen:

Uso de los péptidos VIP y PACAP para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos.

Uso de los péptidos VIP (Péptido intestinal vasoactivo) y PACAP (Péptido inhibidor de la adenilato ciclasa hipofisaria) y de sus fragmentos y derivados, en la preparación de fármacos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en mamíferos. Estos preparados inhiben la producción de citoquinas proinflamatorias y la activación de células Th1, estimulando la activación de células Th2.

ES 2 160 495 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

## DESCRIPCION

Uso de los péptidos VIP y PACAP para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes en la técnica.

## Estado de la técnica

Los procesos inflamatorios son un proceso vital para la supervivencia de todos los organismos complejos. De forma natural la inflamación es un proceso de defensa del organismo frente a un agente extraño. La acumulación y activación de leucocitos en los lugares donde se produce la agresión es un acontecimiento central en todo proceso inflamatorio (Schaal TJ y Bacon KB; Current Opinion in Immunology 1994, 6:865). Una respuesta inflamatoria insuficiente puede comprometer la supervivencia del organismo, pero una respuesta excesiva, que puede deberse a fallos en los mecanismos de desactivación del proceso por distintas causas, puede terminar desencadenando una enfermedad inflamatoria o autoinmune (Sacca R y col.; Current Opinion in Immunology 1997, 9:851). Estas enfermedades son una causa importante de morbilidad y mortalidad en los mamíferos por los daños tisulares asociados a dichos procesos.

Los macrófagos juegan un papel central en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias. La ejecución de estas actividades está mediada por toda una serie de procesos complejos en los que intervienen, entre otros, muchos productos de origen macrófago. Como respuesta a los antígenos, y según su origen, los macrófagos secretan citoquinas proinflamatorias y agentes oxidantes, tales como TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 y óxido nítrico (Laskin DL y col.; Annual Review of Pharmacology and Toxicology 1995, 35:655). TNF $\alpha$  e IL-6 son, entre otros, dos factores que contribuyen a los cambios fisiopatológicos asociados con varios estados de inflamación crónica o aguda. Los macrófagos, además, participan en el inicio, mantenimiento y control de las respuestas inmunes, actuando como potentes presentadores de antígenos, proporcionando a los linfocitos T una doble señal de activación: el complejo antígeno-moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y una señal coestimuladora mediada por moléculas de la familia B7 (Lenschow DJ y col.; Annual Review of Immunology 1996, 14:233). Las moléculas B7 comprenden dos isoformas, B7.1 y B7.2, cada una de ellas implicada en la estimulación de dos tipos de células T colaboradoras (Th) distintas, Th1 y Th2 respectivamente, y cada una de ellas produce un conjunto de citoquinas distintas (Kuchroo VK y col.; Cell 1995, 80:707).

La activación de las células Th1 implica la producción, entre otros factores, de IFN $\gamma$  e IL-12, está asociada a la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a y se manifiesta como una reacción de tipo inflamatorio retardado. La activación de células Th2 implica la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 entre otros factores, está asociado a la secreción de anticuerpos de isotipo IgG1, inhibe la respuesta inflamatoria retardada y se manifiesta como una respuesta humoral (Constant SL y Bottomly K; Annual Review of Immunology 1997, 15:297). Los factores que determi-

nan la diferenciación de uno u otro tipo de respuesta son, principalmente, las características de las células presentadoras de antígenos y las citoquinas presentes en el microambiente en el que se desarrolla la respuesta: IL-12 determina la diferenciación de células Th1 mientras que IL-4 lo hace de Th2. Cuando ambas están presentes predomina el efecto de IL-4 (O'Garra AO; Immunity 1998, 8:275). Numerosos casos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes se deben a la activación de un tipo de células Th inadecuado. Enfermedades tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huésped y otras, se caracterizan por una activación de las células Th1.

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un péptido básico de 28 aminoácidos cuya secuencia es (Mutt V y Said SI; European Biochemistry 1974, 42:581):

His - Ser - Asp - Ala - Val - Phe - Thr - Asp - Asn - Tyr - Thr - Arg - Leu - Arg - Lys - Glu - Met - Ala - Val - Lys - Lys - Tyr - Leu - Asn - Ser - Ile - Leu - Asn - NH<sub>2</sub>

Se aisló en primer lugar a partir de intestino delgado porcino y posteriormente se identificó en el cerebro y en terminaciones nerviosas del sistema periférico, estableciéndose su naturaleza como neuropeptido con propiedades neuromoduladoras (Fahrenkrug J; Pharmacology and Toxicology 1993, 72:354). Su nombre se debe a sus propiedades vasodilatadoras periféricas. También se ha identificado VIP en células cebadas de rata y en granulomas (Cutz E. y col.; Nature 1978, 275:661). Estudios inmunológicos realizados en secciones histológicas de timo, bazo y ganglios linfáticos de rata han identificado VIP inmunoreactivo en linfocitos de estos órganos (Gomariz RP y col.; Annals of the New York Academy of Sciences 1992, 650:13; Leceta y col.; Advances in Neuroimmunology 1996, 6:29).

El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de siete dominios hidrofóbicos acoplados a proteínas G, las cuales transducen la información hasta las moléculas efectoras finales (Laburthe M y Couvineau A; Annals of the New York Academy of Sciences 1988, 527:296). Los receptores para VIP han sido caracterizados en numerosos tejidos como hígado y tejido adiposo entre otros y que corresponden a dos tipos, los llamados VIP1 - R (Ishihara T y col.; Neuron 1992, 8:811) y VIP2 - R (Lutz E. y col.; FEBS Letters 1993, 334:3). En el sistema inmune se han caracterizado receptores específicos para VIP en una variedad de células inmunes que incluyen linfocitos periféricos humanos, monocitos humanos, linfocitos de rata y de ratón, macrófagos alveolares de rata y macrófagos peritoneales de rata y ratón (Gomariz RP y col.; Biochemical and Biophysical Research Communications 1994, 203:1599; Delgado M y col.; Regulatory Peptides 1996, 62:161). El VIP modula una gran variedad de funciones inmunes como son la función fagocítica, en cada una de las etapas del proceso, la respuesta proliferativa, la producción de inmunoglobulinas, la actividad NK y la producción de citoquinas (De La Fuente M y col.; Advances in Neuroimmunology 1996, 6:75).

El péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) es un miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagon del que se conocen dos formas moleculares PACAP - 38 y PACAP - 27, cuyas secuencias son respectivamente (Ogi K y col.; Biochemical and Biophysical Research communication 1993, 196:1511):

PACAP - 38

His - Ser - Asp - Gly - Ile - Phe - Thr - Asp - Ser - Tyr - Ser - Arg - Tyr - Arg - Lys - Gln - Met - Ala - Val - Lys - Lys - Thy - Leu - Ala - Ala - Val - Leu - Gly - Lys - Arg - Tyr - Lys - Gln - Arg - Val - Lys - Asn - Lys - NH<sub>2</sub>

PACAP - 27

His - Ser - Asp - Gly - Ile - Phe - Thr - Asp - Ser - Tyr - Ser - Arg - Tyr - Arg - Lys - Gln - Met - Ala - Val - Lys - Lys - Thy - Leu - Ala - Ala - Val - Leu - NH<sub>2</sub>

Ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico.

También hay células productoras de PACAP en pulmón, células B pancreáticas e intestino (Arimura A; Regulatory Peptides 1992, 37:287).

En el sistema inmune se ha descrito una gran abundancia de células positivas para PACAP en órganos linfoides centrales y periféricos (Gaytan F y col.; Cell and Tissue Research 1994, 276:233).

Para el PACAP se han descrito tres tipos de receptores (Shivers BD y col.; Endocrinology 1991, 128:3055; Inagaki N y col.; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1994, 91:2679): el receptor de PACAP tipo I (PACAP - R - I) con igual afinidad para el PACAP - 38 y el PACAP - 27, pero que posee una afinidad de 300 a 1000 veces menor por el VIP; el receptor de PACAP tipo II (PACAP - R - II) que reconoce con la misma afinidad al VIP, PACAP - 38 y PACAP - 27 por lo que se le denomina receptor común de VIP - PACAP y corresponde al receptor de VIP VIP1 - R, y el receptor de PACAP tipo III (PACAP - R - III) que corresponde al receptor de VIP VIP2 - R. Hasta el momento, son escasos los estudios sobre las acciones biológicas del PACAP en el sistema inmune. Los efectos del PACAP son en muchos casos similares a los del VIP modulando la función fagocítica y las respuestas proliferativas.

#### Descripción de la invención

El objeto de esta invención es desarrollar preparados de VIP, PACAP y análogos como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

El tratamiento consiste en la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) o de IL - 6 en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o bien la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente que aumente la producción de IL - 4, inhibiendo la activación de células Th1 y estimulando la activación de células Th2. Estos agentes son VIP, PACAP o alguno de sus fragmentos activos.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por varios tipos celulares que incluyen monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células cebadas, células tumorales y fibroblastos. Es un importante factor regulador de otras citoci-

nas pro - inflamatorias, como son IL - 1 $\beta$ , IL - 6 e IL - 8. El TNF $\alpha$  induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, activa a los leucocitos para que destruyan los microorganismos, actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas que contribuyen a la respuesta de fase aguda y activa el sistema de coagulación. Su sobreproducción conduce a enfermedades inmunopatológicas, autoinmunidad e inflamación.

La IL - 6 es una citoquina multifuncional producida tanto por linfocitos como por células no linfoides. Regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la producción de proteínas que median la fase aguda y la hematopoyesis. Además actúa como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción está regulada por varios factores, que incluyen TNF $\alpha$ , IL - 1 y endotoxina bacteriana (LPS).

La IL - 4 es una citoquina que inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados y aumenta la expresión de moléculas MHC de tipo II en linfocitos B. Se ha puesto de relieve su posible utilización clínica en tratamientos antiinflamatorios y enfermedades autoinmunes.

Se han ensayado estrategias de neutralización de citoquinas proinflamatorias en el tratamiento de enfermedades inflamatorias pero los resultados no muestran que se produzca una mejoría a largo plazo. La administración de VIP y PACAP en modelos animales consigue estos efectos y nuestro invento consiste en la utilización de un tratamiento con estos neuropéptidos para revertir estados inflamatorios patológicos y enfermedades autoinmunes.

El VIP y el PACAP tienen efectos antiinflamatorios e inhiben la producción de IL - 6 y TNF $\alpha$ . Además VIP y PACAP modulan la capacidad de las células presentadoras de antígenos para actuar induciendo la activación proliferación y diferenciación de linfocitos con un patrón de secreción de citoquinas típico de las células Th2 y condicionan las respuestas inmunes "in vivo" favoreciendo el desarrollo de respuestas de tipo humoral e inhibiendo respuestas de tipo celular.

#### Descripción de las figuras

La Figura 1 representa la producción de TNF $\alpha$  por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) estimuladas con  $10 \text{ ng/ml}$  de LPS en presencia o ausencia de  $10^{-8} \text{ M}$  de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 2 representa la producción de TNF $\alpha$  por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) después de 6 horas en cultivo con  $10 \text{ ng/ml}$  de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos,  $10^{-8} \text{ M}$  de VIP o PACAP.

La Figura 3 representa la producción de IL - 6 por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) estimuladas con  $10 \text{ ng/ml}$  de LPS en presencia o ausencia de  $10^{-8} \text{ M}$  de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 4 representa la producción de IL - 6 por parte de macrófagos murinos en cultivo ( $5 \times 10^5$  células/ml) después de 6 horas en cultivo con  $10 \text{ ng/ml}$  de LPS y a los que se añadió, a

distintos tiempos,  $10^{-8}$  M de VIP o PACAP.

La Figura 5 presenta el análisis por Northern blot para la presencia de mRNA de TNF $\alpha$  e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de VIP o PACAP (18S representa el correspondiente rRNA como control de la cantidad total de RNA cargada).

La Figura 6 representa la supervivencia de ratones inyectados con 400  $\mu$ gr. de LPS y simultáneamente o a los 30 minutos, 1 o 4 horas con 5 nmol. de VIP o PACAP.

A: Control; B: VIP a 0 h.; C: VIP a 0,5 h.; D: VIP a 1 h.; E: VIP a 4 h.

La Figura 7 representa el número de células secretoras de IL-4 en bazo y peritoneo detectadas mediante la técnica de ensayo por inmunoadsorción en placa conjugado con enzima (ELISPOT) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 7 y que simultáneamente a la segunda inyección del antígeno recibieron 5 nmol de VIP o PACAP o una inyección de solución salina.

La Figura 8 representa la cantidad de inmunoglobulinas anti-hemocianina de caracol (anti-KLH) de los isotipos IgG2a e IgG1 detectables en suero mediante la técnica de ensayo por inmunoadsorción conjugado con enzima (ELISA) en ratones inmunizados en las condiciones especificadas en el Ejemplo 8 y tomadas las muestras de suero dos semanas después de la última inyección.

La Figura 9 representa el número de células productoras de IL-4 detectadas mediante la técnica de ELISPOT en ratones que fueron inmunizados en las condiciones especificadas en los Ejemplos 7 y 8 y que en la segunda inyección recibieron o no 5 nmol de VIP junto con 100  $\mu$ gr de IgG, anti-B7.1 o anti-B7.2.

#### Modo de realización de la invención

Los ejemplos que siguen son solo para ilustrar los resultados conseguidos y no limitan la utilización del invento que se detallan en las reivindicaciones especificadas.

#### Ejemplo 1

*VIP y PACAP inhiben la producción de TNF $\alpha$  en macrófagos estimulados con LPS*

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de TNF $\alpha$  en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 60% y se produce con dosis de estimulación entre 1 - 10 ngr./ml de LPS. La IC<sub>50</sub> es de unos 80 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 1). El efecto inhibitor es el mismo si ambos neuropéptidos se añaden hasta 1 hora después de estimular los macrófagos con LPS, aunque disminuye progresivamente hasta desaparecer si se añaden después de 4 horas (ver Figura 2).

#### Ejemplo 2

*VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de TNF $\alpha$  después de la inyección de LPS*

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de TNF $\alpha$  2 horas después de la inyección de 25  $\mu$ gr. de LPS se aproximaron a los 4 ngr./ml. La administración simultánea de 5 nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60%.

#### Ejemplo 3

*VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS*

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 90% y se produce con dosis de estimulación de 10  $\mu$ gr./ml de LPS. La IC<sub>50</sub> es de 8.6 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 3). El efecto inhibitor también se observa si los neuropéptidos se añaden después de la estimulación con LPS, aunque el grado de inhibición es progresivamente menor (ver Figura 4).

#### Ejemplo 4

*VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de IL-6 después de la inyección de LPS*

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de IL-6 dos horas después de la inyección de 25  $\mu$ gr. de LPS se aproximaron a 1.5 ngr./ml. La administración simultánea de 5 nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60% y un 75% respectivamente.

#### Ejemplo 5

*VIP y PACAP regulan la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 a nivel transcriptional*

Se sometieron macrófagos de ratón a las condiciones experimentales de los ejemplos 1 y 3 y se aisló su mRNA, que después se analizó mediante Northern blot para detectar mRNA de TNF $\alpha$  e IL-6. La Figura 5 muestra la ausencia de transcritos para TNF $\alpha$  o IL-6 cuando los macrófagos activados con LPS son expuestos además a VIP o PACAP.

#### Ejemplo 6

*VIP y PACAP protegen de los efectos letales de LPS*

Se realizó un experimento en el que se estudio la supervivencia a lo largo de un periodo de 4 días en ratones después de inyectarles 400  $\mu$ gr. de LPS. Los resultados se reflejan en la Figura 6. La mortalidad en estas circunstancias fue del 100% a las 36 horas. Con la administración simultánea de 5 nmol. de VIP o PACAP se consiguió una supervivencia del 60% al final del experimento. La administración de los neuropéptidos hasta 1 hora después de la inyección de LPS todavía registró tasas de supervivencia cercanas al 50%.

#### Ejemplo 7

*VIP y PACAP aumentan la proporción de células secretoras de IL-4*

Grupos de ratones fueron inmunizados con 50  $\mu$ gr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100  $\mu$ gr de KLH dos se después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se realizaron suspensiones celulares de bazo y peritoneo que fueron cultivadas durante 24 horas en presencia de 50  $\mu$ gr/ml de KLH, tras lo cual se determinó el número de células productoras de IL-4 mediante la técnica de ELISPOT. En los ratones inyectados con VIP o PACAP el número de células productoras de IL-4 aumentó del orden de 20 veces sobre los que no fueron tratados con estos neuropéptidos (ver Figura 7).

## Ejemplo 8

*VIP y PACAP inducen la producción de anticuerpos del isotipo IgG1*

Grupos de ratones fueron inmunizados con 50  $\mu$ gr de KLH emulsionados en un adyuvante, repitiéndose la inyección con 100  $\mu$ gr de KLH dos semanas después e inyectando simultáneamente 5 nmol/ratón de VIP, PACAP o solución salina. Dos semanas después de la última inyección se determinaron los niveles de anti - KLH y su isotipo mediante ELISA específico para los isotipos IgG1 e IgG2a. En los ratones inyectados con VIP o PACAP los anticuerpos anti - KLH detectables en suero dos semanas después de la última inmunización son solamente del isotipo IgG1, mientras que en los que solamente recibieron solución salina fueron del isotipo IgG2a (ver Figura 8).

## Ejemplo 9

*El aumento de la proporción de células productoras de IL - 4 mediado por VIP y PACAP está relacionado con la expresión de B7.2 inducida por ambos neuropéptidos*

Grupos de ratones fueron inmunizados en las mismas condiciones de los Ejemplos 7 y 8, pero en el momento de la segunda inmunización con KLH los ratones que fueron inyectados simultáneamente con VIP o PACAP recibieron al mismo tiempo 100  $\mu$ gr de anticuerpo anti - B7.1, anti - B7.2 o la misma cantidad de IgG como control. En los ratones que recibieron anticuerpos anti - B7.2 simultáneamente a la administración de los neuropéptidos el número de células productoras de IL - 4 se redujo a la proporción alcanzada en los animales que no fueron inyectados con los neuropéptidos (ver Figura 9).

**REIVINDICACIONES**

1. Uso del péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes caracterizadas por la activación de células Th1, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huésped y otras, debido a su capacidad como agentes inhibidores de las células Th1 y citoquinas proinflamatorias.

2. Uso del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado para la preparación de un fármaco destinado al tratamiento de patologías inflamatorias o autoinmunes caracterizadas por la activación de células Th1, tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huésped y otras, debido a su capacidad como agentes inhibidores de las células Th1 y citoquinas proinflamatorias.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ① ES 2 160 495  
② N.º solicitud: 009901235  
③ Fecha de presentación de la solicitud: 04.06.1999  
④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.º: A61K 38/22, A61P 37/02

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría   | Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|---|--|----------------------------|
| X   | GANEÁ, D. "Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs". ADVANCES IN NEUROIMMUNOLOGY. 1996, Vol. 6, nº 1, páginas 61-74, todo el documento. | 1,2                        |
| <b>Categoría de los documentos citados</b><br>X: de particular relevancia<br>Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría<br>A: refleja el estado de la técnica<br><br>O: referido a divulgación no escrita<br>P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud<br>E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud |  |                            |
| <b>El presente informe ha sido realizado</b><br><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones<br><input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:   |  |                            |
| <b>Fecha de realización del informe</b><br>24.08.2000   | <b>Examinador</b><br>M. Novoa Sanjurjo   | <b>Página</b><br>1/1       |

VERIFICATION OF TRANSLATION

**PATRICIA KOCH MORENO**  
INGLES Y ALEMAN  
c/. Ramón de Santillán, 15  
Telf.: 91 458 61 41 - MADRID

I, Patricia Koch Moreno of Herrero & Asociados, S.L., Alcalá 35, 28014 Madrid, Spain, hereby declare that I am conversant with the Spanish and English languages and that I am the translator of the document attached and certify that to the best of my knowledge and belief the following is a true and correct English translation of the document in Spanish language.

Dated this 28<sup>th</sup> day of April 2008

**PATRICIA KOCH MORENO**  
INGLES Y ALEMAN  
c/. Ramón de Santillán, 15  
Telf.: 91 458 61 41 - MADRID



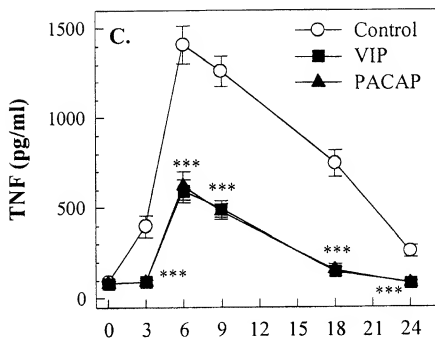


Spanish:

*Numerosos casos de enfermedades inflamatorias y autoinmunes se deben a la activación de un tipo de células Th inadecuado. Enfermedades tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, reacción injerto contra huésped y otras, se caracterizan por una activación de las células Th1.*

English translation:

*Many cases of inflammatory and autoimmune diseases are caused by the activation of the wrong type of Th cells. Diseases such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Crohn's disease, graft versus host reaction and others are characterised by an activation of Th1 cells.*

**FIGURA 1**

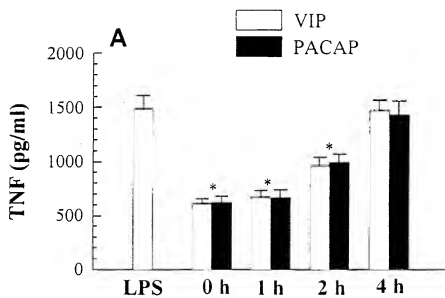


FIGURA 2

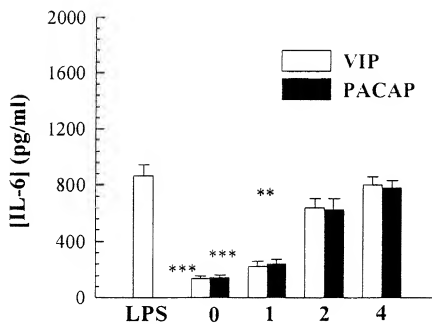


FIGURA 3

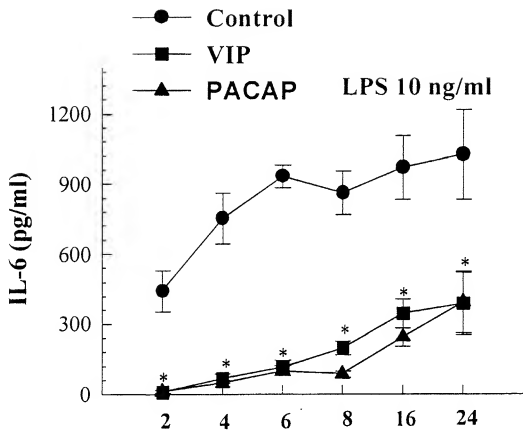


FIGURA 4

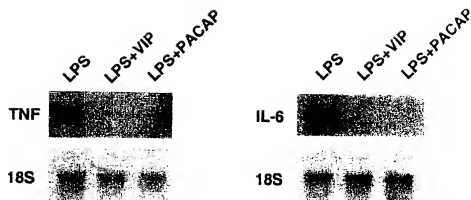


FIGURA 5

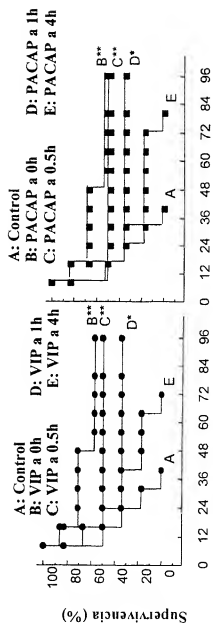


FIGURA 6

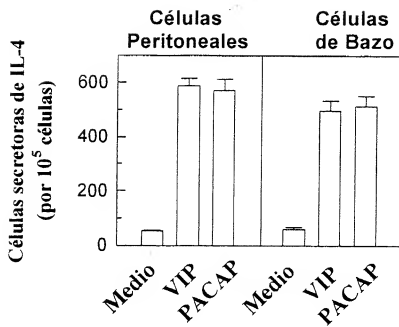


FIGURA 7



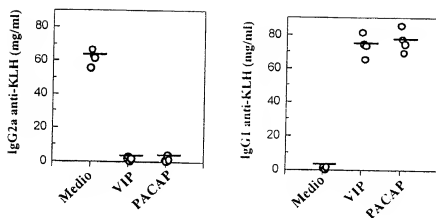
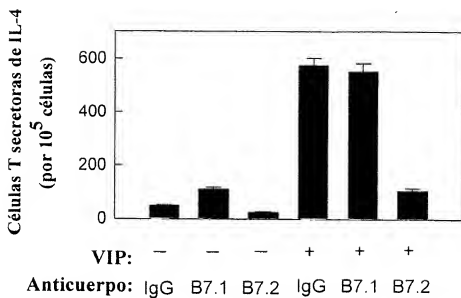


FIGURA 8



**FIGURA 9**